

# DETECTION METHOD OF INSPECTION COMPOUND, AND DIAMOND ELECTRODE AND DEVICE USED THEREFOR

**Publication number:** JP2003121410 (A)

**Publication date:** 2003-04-23

**Inventor(s):** FUJISHIMA AKIRA; TATA NARASINGA RAO; BURUSU BENGATA SARADA +

**Applicant(s):** FUJISHIMA AKIRA +

**Classification:**

- **International:** G01N31/00; C12M1/34; C12M1/40; C12Q1/00; C12Q1/26; C12Q1/54; C12Q1/60; G01N27/28; G01N27/30; G01N27/327; G01N27/416; G01N31/00; C12M1/34; C12M1/40; C12Q1/00; C12Q1/26; C12Q1/54; C12Q1/60; G01N27/28; G01N27/30; G01N27/327; G01N27/416; (IPC1-7): G01N27/416; C12M1/34; C12M1/40; C12Q1/00; C12Q1/26; C12Q1/54; C12Q1/60; G01N27/28; G01N27/30; G01N27/327; G01N31/00

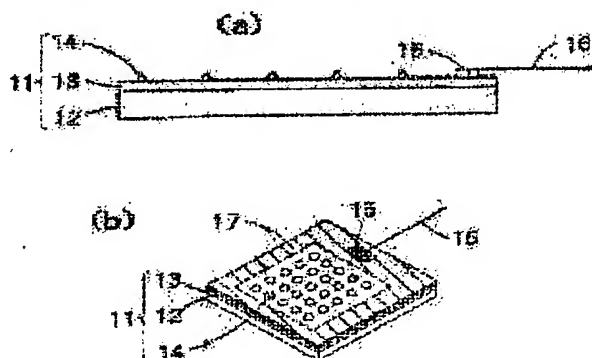
- **European:**

**Application number:** JP20010315660 20011012

**Priority number(s):** JP20010315660 20011012

## Abstract of JP 2003121410 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for detecting, a specifically, easily in a short time, the concentration of hydrogen peroxide or an inspection compound generating hydrogen peroxide by an enzyme reaction. **SOLUTION:** An inspection sample containing hydrogen peroxide, and a conductive diamond electrode carrying one or more catalyst metals selected from a group comprising iridium, rhodium, ruthenium, palladium and platinum are prepared, and the inspection sample containing the hydrogen peroxide is brought into contact with the diamond electrode as a working electrode and a counter electrode. A voltage for generating an oxidation reaction and a reduction reaction of the hydrogen peroxide on the diamond electrode is applied between the diamond electrode and the counter electrode, and a current under the voltage is detected.



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号  
特開2003-121410  
(P2003-121410A)

(43)公開日 平成15年4月23日(2003.4.23)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード*(参考)
G 0 1 N 27/416		C 1 2 M 1/34	E 2 G 0 4 2
C 1 2 M 1/34		1/40	B 4 B 0 2 9
1/40		C 1 2 Q 1/00	C 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/00		1/26	
1/26		1/54	

審査請求 未請求 請求項の数20 O L (全 14 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001-315660(P2001-315660)

(22)出願日 平成13年10月12日(2001.10.12)

(71)出願人 591115936

藤嶋 昭

神奈川県川崎市中原区中丸子710-5

(72)発明者 藤嶋 昭

神奈川県川崎市中原区中丸子710-5

(72)発明者 タタ、ナラシंगा、ラオ

東京都文京区本郷6-21-4-407

(72)発明者 ブルス、ベンガタ、サラダ

東京都文京区本郷6-21-4-407

(74)代理人 100075812

弁理士 吉武 賢次 (外4名)

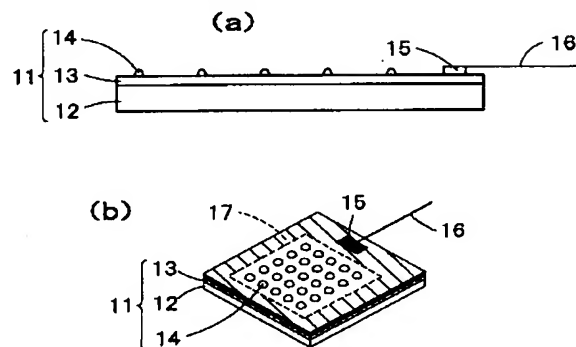
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 被検化合物の検出方法、およびそれに用いるダイヤモンド電極および装置

(57)【要約】

【課題】 過酸化水素、または酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の濃度を特異的かつ短時間で容易に検出する方法の提供。

【解決手段】 過酸化水素を含有する被検試料と、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属が担持されてなる導電性ダイヤモンド電極とを用意し、該過酸化水素を含有する被検試料と、作用電極としての前記ダイヤモンド電極と、対電極とを接触させ、前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加し、該電圧下における電流を検出する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】過酸化水素の検出方法であって、過酸化水素を含有する被検試料と、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属が担持されてなる導電性ダイヤモンド電極とを用意し、

該過酸化水素を含有する被検試料と、作用電極としての前記ダイヤモンド電極と、対電極とを接触させ、前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加し、該電圧下における電流を検出することを含んでなる、方法。

【請求項2】酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の検出方法であって、被検化合物を含有する被検試料と、前記被検化合物と反応して過酸化水素を生成する酵素と、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属が担持されてなる導電性ダイヤモンド電極とを用意し、

前記被検試料を前記酵素に接触させて過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を含有する被検試料と、作用電極としての前記ダイヤモンド電極と、対電極とを接触させ、前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加し、該電圧下における電流を検出することを含んでなる、方法。

【請求項3】前記電流を検出する工程が、電流値または電気量を測定し、得られた電流値または電気量から前記被検試料中の被検化合物の濃度を算出することをさらに含んでなる、請求項1または2のいずれか一項に記載の方法。

【請求項4】得られた電流値または電気量から被検化合物の濃度を算出する工程が、予め作成された被検化合物濃度と電流値または電気量との検量線と、得られた電流値または電気量とを対比することにより行われる、請求項3に記載の方法。

【請求項5】前記酵素が担体に担持されてなり、該担体が反応器内に充填されてなる、請求項2～4のいずれか一項に記載の方法。

【請求項6】前記被検化合物の供給が、キャリアとしての溶液を一定流速で系内を流しながら、該キャリア溶液中に被検溶液を注入することにより行われる、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】前記触媒金属が、前記導電性ダイヤモンドの表面に粒子状に担持されてなる、請求項1～6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】前記被検化合物および前記酵素が、グルコースおよびグルコースオキシダーゼ組合せ、シュウ酸およびシュウ酸オキシダーゼの組合せ、L-アミノ酸およびL-アミノ酸オキシダーゼの組合せ、コリンおよびコリンオキシダーゼの組合せ、アミンおよびアミンオキシダーゼの組合せ、アルコールおよびアルコールオキシダーゼの組合せ、コレステロールおよびコレステロールオキシダーゼの組合せ、アスコルビン酸およびアスコルビン酸オキシダーゼの組合せ、サルコシンおよびサルコシンオキシダーゼの組合せ、ラクテートおよびラクテートオキシダーゼの組合せ、ならびにグルタメートおよびグルタメートオキシダーゼの組合せからなる群から選択される、請求項2～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】前記被検化合物がクレアチニンであり、かつ、前記酵素が、クレアチニンアミダヒドラーゼ、クレアチンアミジノヒドラーゼ、およびサルコシンオキシダーゼの三種類の酵素を含んでなる、請求項2～7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】前記三種類の酵素が、クレアチニンアミダヒドラーゼ、クレアチンアミジノヒドラーゼ、サルコシンオキシダーゼの順に、前記反応器内の、被検試料の流出方向に連続する三つの領域に分離されて収容されてなる、請求項9に記載の方法。

【請求項11】前記三種類の酵素が、前記反応器内に混合された状態で収容されてなる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】前記ダイヤモンド電極上で酸化反応または還元反応の生じる電圧が、ピーク電流を与える電圧である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】前記ダイヤモンド電極上で酸化反応または還元反応の生じる電圧が、バックグラウンド電流と酸化反応または還元反応により生じる電流との差が最も大きくなる電圧である、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項14】導電性ダイヤモンドと、その上に担持される、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属とを有してなる、ダイヤモンド電極。

【請求項15】前記触媒金属が、前記導電性ダイヤモンドの表面に粒子状に担持されてなる、請求項14に記載のダイヤモンド電極。

【請求項16】過酸化水素の濃度を検出または定量するために用いられる、請求項14または15に記載のダイヤモンド電極を備えてなる、センサ。

【請求項17】酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物を検出または定量するために用いられる、請求項14または15に記載のダイヤモンド電極を備えてなる、センサ。

【請求項18】請求項1、3、4、6、7、12、および13のいずれか一項に記載の、過酸化水素の検出方法を実施するための装置であって、

過酸化水素を含有する被検試料に、作用電極としての請求項14または15に記載されるダイヤモンド電極、お

および対電極を接触させる手段と、  
前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加する手段と、  
該印加電圧下において両電極間に流れる電流を検出する手段とを少なくとも備えてなる、装置。

【請求項19】請求項2～13のいずれか一項に記載の、酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の検出方法を実施するための装置であって、  
前記被検化合物と反応して過酸化水素を生成する酵素が担持されてなる触媒担体が充填されてなる反応器と、  
該反応器に前記被検化合物を含有する被検試料を導入する手段と、  
該反応器を通過した被検試料に、作用電極としての請求項14または15に記載されるダイヤモンド電極、および対電極を接触させる手段と、  
前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加する手段と、  
該印加電圧下において両電極間に流れる電流を検出する手段とを少なくとも備えてなる、装置。

【請求項20】前記電流を検出する手段が電流値または電気量を測定するものであり、前記装置が、得られた電流値または電気量から被検試料中の被検化合物濃度を算出する手段をさらに備えてなる、請求項18または19に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】発明の分野

本発明は、過酸化水素、および酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の検出方法、およびそれに用いるダイヤモンド電極および装置に関する。

【0002】背景技術

ダイヤモンドは本来抵抗率が $10^{13} \Omega \text{cm}$ 程度の絶縁材料であるが、微量不純物のドーピングにより導電性を獲得する。この導電性ダイヤモンドには、種々の用途が期待されている。その一つに電気化学用の電極としての利用がある。導電性とされたダイヤモンドを電気化学用の電極として見ると、広い電位窓を有し、かつバックグラウンド電流が極めて小さいという優れた特長を有する。さらに、物理的、化学的に安定であり、耐久性に優れるとの特長もまた有する。導電性ダイヤモンド（好ましくはその薄膜）を有する電極は、ダイヤモンド電極と一般的に呼ばれるに至っている。

【0003】ダイヤモンド電極に関する先駆的研究はIwakiらによって行われた（Iwaki et al., Nuclear Instruments and Methods, 209-210, 1129(1983)）。彼らは、アルゴンや窒素イオンを打ち込んで表面導電性を付与した単結晶ダイヤモンドの電気伝導材料としての性質を研究したものである。同時に、電解質溶液中におけるサイ

クリックボルタモグラムの示した。その後、ホットフィラメントを用いて気相合成した多結晶ダイヤモンド電極の特性が報告されている（Pleskov et al., J. Electroanal. Chem., 228, 19(1993)）。

【0004】本発明者らの一部は、気相合成したダイヤモンド電極を用いて、窒素酸化物の還元について先に報告した（Tenne et al., J. Electroanal. Chem., 347, 409(1993)）。この研究では、ドーパントとしてホウ素を導入したp型半導体ダイヤモンドを電極として使用した。その後、ダイヤモンド電極としては、ホウ素をドーパントとするp型半導体またはより導電性の高い金属様導電性ダイヤモンドの利用が主流となるに至る。1990年代に入って、ダイヤモンド電極の研究が複数のグループにより行われ、1995年以降は、より大面積のダイヤモンド薄膜が得られるプラズマCVD（PCVD）装置を用いて得られたダイヤモンド電極の研究が、電気化学分野にも散見されるに至っている。

【0005】ところで、近年、糖尿病の患者数が増加の一途を辿っている。この糖尿病の診断は、従来、血液中のグルコース濃度を測定することにより行われるのが一般的であったが、採血を要し、その分析にも時間を要することから、より簡便な方法が求められていると言える。

【0006】また、腎臓機能等の診断のために血液や尿中のクレアチニン濃度を測定することが行われているが、この測定も除タンパク、酸化、呈色、比色、計算等の多くのステップを経なければならず、より簡便な方法が求められている。

【0007】一方、多くの物質とりわけ生体関連物質には、それを酸化し、過酸化水素を発生させる酵素が存在する。例えば、グルコースを酸化するグルコースオキシダーゼは、グルコースをラクトンに変換し、同時に過酸化水素を発生させる。

【0008】

【発明の概要】本発明者らは、今般、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属が担持されてなる導電性ダイヤモンド電極が過酸化水素に特異的に感応し、その酸化電位または還元電位における電流から、その存在を高感度に検出し、かつ、その存在量を高精度に測定できるとの知見を得た。そして、この性質を利用することにより、酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物について、その存在を高い選択性で高感度に検出し、かつ、その存在量を高精度に測定できるとの知見を得た。

【0009】したがって、本発明は、過酸化水素、および酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物を高い選択性で簡便かつ高感度に検出し、必要に応じてその存在量を簡便かつ高精度に測定することをその目的としている。

【0010】そして、本発明による過酸化水素の検出方法は、過酸化水素を含有する被検試料と、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属が担持されてなる導電性ダイヤモンド電極とを用意し、該過酸化水素を含有する被検試料と、作用電極としての前記ダイヤモンド電極と、対電極とを接触させ、前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加し、該電圧下における電流を検出することを含んでなる。

【0011】また、本発明による、酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の検出方法は、被検化合物を含有する被検試料と、前記被検化合物と反応して過酸化水素を生成する酵素と、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属が担持されてなる導電性ダイヤモンド電極とを用意し、前記被検試料を前記酵素に接触させて過酸化水素を生成させ、該過酸化水素を含有する被検試料と、作用電極としての前記ダイヤモンド電極と、対電極とを接触させ、前記ダイヤモンド電極と、前記対電極との間に、前記ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応が生じる電圧を印加し、該電圧下における電流を検出することを含んでなる。

#### 【0012】

##### 【発明の具体的説明】被検試料

本発明による方法の被検対象となるものは、過酸化水素を含有する溶液等の試料、または酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物を含有する溶液等の試料である。本発明によれば、これらの試料中における過酸化水素、および酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物を高感度に検出し、かつその存在量を高精度に測定することが出来る。なお、本明細書において、過酸化水素、および酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物をまとめて「被検化合物」と総称する。酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の好ましい例としては、グルコース、シュウ酸、L-アミノ酸、コリン、アミン、アルコール、コレステロール、アスコルビン酸、サルコシン、ラクテート、グルタメート、クレアチニンなどが挙げられる。被検試料は、上記被検化合物が含まれていると考えられる生体由来の血液、体液等、または食品もしくは食品の希釈溶液または懸濁液であってよい。例えば、尿を被検試料とし、本発明の方法により尿中のグルコース濃度を知ることにより、尿糖値測定による糖尿病診断に有効となる。また、血液を被検試料とし、本発明の方法により血液中のクレアチニン濃度を知ることにより、腎臓機能の診断に有効となる。

##### 【0013】ダイヤモンド電極およびその製造

ダイヤモンドは本来優れた絶縁体である。しかしながら、3族や5族の不純物を添加することによって、半導

体～金属様の導電性を示すようになる。本発明にあっては、半導体～金属様の導電性を示すダイヤモンドを電極として使用する。

【0014】このような導電性を付与するために添加される物質としては、上記の通り3族および5族の元素が挙げられ、さらに好ましくはホウ素、窒素、リンが挙げられ、最も好ましくはホウ素または窒素である。この導電性を付与するために添加される物質の添加量は、ダイヤモンドに導電性を付与できる範囲で適宜決定されてよいが、例えば $1 \times 10^{-2} \sim 10^{-6} \Omega \text{cm}$ 程度の導電性を与える量添加されることが好ましい。この導電性を付与するために添加される物質の添加量は、導電性ダイヤモンドの製造工程における添加量により制御されることが一般的である。

【0015】本発明によるダイヤモンド電極は、この導電性ダイヤモンドを電極として用い、その上にさらに触媒金属を担持させたものである。そして、触媒金属としては、イリジウム、ロジウム、ルテニウム、パラジウム、および白金からなる群から選択される一以上の触媒金属を用いるものとし、好ましくはイリジウムおよびロジウムであり、最も好ましくはイリジウムである。これらの触媒金属が担持されたダイヤモンド電極は、電気化学反応を水中で行うと、過酸化水素の酸化反応または還元反応を特異的に生じ、その反応により生じた電流値または電流量を高い感度で正確に検出できるとの極めて興味深い特性を有していた。この特性は、触媒金属がどのような形態であれ、導電性ダイヤモンド上に担持されていれば得られるものと考えられる。また、上記触媒金属のいずれかを単独で導電性ダイヤモンド上に担持させてもよいし、上記触媒金属の2種以上を、別個の金属として、あるいは合金として、導電性ダイヤモンド上に担持させてもよい。

【0016】本発明の好ましい態様によれば、触媒金属が導電性ダイヤモンド上に粒子状に担持されてなることができる。触媒金属粒子の粒径は、特に限定されないが、走査型電子顕微鏡（SEM）により測定された粒子個々の粒径が $50 \sim 1,000 \text{nm}$ であるのが好ましく、より好ましくは $200 \sim 500 \text{nm}$ である。

【0017】本発明の好ましい態様によれば、基材上に導電性ダイヤモンドの薄膜を形成し、さらにこの導電性ダイヤモンド薄膜に触媒金属を担持させるとともに、導線を接続させ、電極とすることが好ましい。基材としては、Si（例えば、単結晶シリコン）、Mo、W、Nb、Ti、Fe、Au、Ni、Co、 $\text{Al}_2\text{O}_3$ 、SiC、 $\text{Si}_3\text{N}_4$ 、 $\text{ZrO}_2$ 、MgO、黒鉛、単結晶ダイヤモンド、cBN、石英ガラス等が挙げられ、特に単結晶シリコン、Mo、W、Nb、Ti、SiC、単結晶ダイヤモンドの利用が好ましい。

【0018】この態様の電極を図1を用いて更に説明する。図1(a)は、イリジウム担持ダイヤモンド電極1

1の断面図であり、この電極は、基材12の上に形成された導電性ダイヤモンド薄膜13と、その上に粒子状に担持されたイリジウム粒子14とからなり、さらにこの導電性ダイヤモンド薄膜13には導線16が例えば金コーティング15を介して接続される。図1(b)は、ダイヤモンド電極11の斜視図であり、基材12の上に形成された導電性ダイヤモンド薄膜13と、その上に担持されたイリジウム粒子14とからなり、さらにこの導電性ダイヤモンド薄膜13を電極とするための金コーティング15を介して導線16が接続される。また、図1(b)に点線で示されるように、ダイヤモンド電極11のイリジウム粒子14側の最表面の外縁および端部側面に、保護膜17を形成してもよい。この保護膜17は、エポキシ樹脂等の絶縁性の樹脂で形成されるのが好ましく、これによりダイヤモンド電極11の端部側面、金コーティング15、および導線16を電気化学的に安定な状態が確保されるように保護して、より安定かつ正確な測定を可能にする。

【0019】導電性ダイヤモンド薄膜の厚さは、特に限定されないが、1～100 $\mu$ m程度の厚さが好ましく、より好ましくは5～50 $\mu$ m程度である。

【0020】さらに本発明の好ましい態様によれば、本発明によるダイヤモンド電極は、マイクロ電極の形態をとることが出来る。マイクロ電極の概念は既に公知であり、本発明においてマイクロ電極形態のダイヤモンド電極とは、Pt、W、Mo等の細線の末端を鋭利に切断し、電解研磨により末端をさらに鋭利にした後、その末端表面に導電性ダイヤモンドの薄膜を形成した構成のものを意味する。

【0021】本発明の好ましい態様によれば、導電性ダイヤモンド薄膜は、化学気相成長法により好ましく製造される。化学気相成長法とは、気相中で気体原料を化学反応させて物質を合成する方法であり、CVD (Chemical Vapor Deposition) 法と一般に呼ばれる。この方法は、半導体製造プロセスにおいて広く利用されており、本発明における導電性ダイヤモンド薄膜の製造にも合目的な改変のもと利用可能である。

【0022】ダイヤモンドの化学気相合成は、メタンなどの含炭素気体と水素を混合したものを原料気体として、それを励起源により励起させ、基板上に供給して堆積させることにより行われる。

【0023】励起源としては、熱フィラメント、マイクロ波、高周波、直流グロー放電、直流アーク放電、燃焼炎などが挙げられる。また、これらを複数組み合わせる核生成密度を調整したり、大面積化や均一化を図ることも可能である。

【0024】原料としては、炭素の含まれている多くの種類の、励起源により分解、励起されて、C、C<sub>2</sub>などの活性な炭素、およびCH、CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>などの炭化水素ラジカルを生じさせる化合物を利用可能

である。好ましい具体例としては、気体としてCH<sub>4</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>、C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>、C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>、CO、CF<sub>4</sub>、液体としてCH<sub>3</sub>OH、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO、固体として黒鉛、フラーレンなどが挙げられる。

【0025】気相合成法にあって、ダイヤモンドに導電性を付与する物質の添加は、例えば添加物質のディスクを系内に置き、炭素源原料と同様に励起させ、炭素気相に添加物質を導入する方法、炭素源に予め添加物質を添加し、系内に炭素源と共に導入し、励起源により励起し、炭素気相に添加物質を導入する方法等により行うことが出来る。本発明の好ましい態様によれば、後者の方法が好ましい。とりわけ、炭素源としてアセトン、メタノールなどの液体を用いる場合、これに酸化ボロン(B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)を溶解してボロン源とする方法が、ボロンの濃度の制御が容易で、かつ簡便であることから好ましい。例えば、気相合成法にあって、炭素源にホウ素を添加する場合、10～12,000ppm程度が一般的であり、また1,000～10,000ppm程度が好ましい。

【0026】本発明の好ましい態様によれば、導電性ダイヤモンド薄膜の製造はプラズマ化学気相合成法により行われることが好ましい。このプラズマ化学気相合成法は、化学反応を引き起こす活性化エネルギーが大きく、反応が速いとの利点を有する。さらに、この方法によれば、熱力学的に高温でなければ存在しない化学種を生成して、低い温度での反応が可能となる。プラズマ化学気相合成法による導電性ダイヤモンド薄膜の製造は、本発明者らの一部を含めいくつかの報告が既にあり(例えば、Yano et al., J. Electrochem. Soc., 145(1998) 1870)、これら報告に記載の方法に従って行うことが好ましい。

【0027】本発明において、触媒金属を導電性ダイヤモンド上に担持させる方法は、特に限定されず、種々の方法により行うことができる。

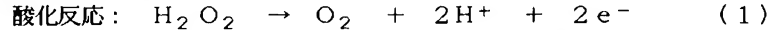
【0028】本発明の好ましい態様によれば、イリジウムを導電性ダイヤモンド上に担持させる場合、導電性ダイヤモンドをイリジウムイオンを含有する溶液に浸漬し、負の電圧を導電性ダイヤモンドに印加して、導電性ダイヤモンド上にイリジウムを析出させることにより行うことができる。このような溶液の好ましい例としては、イリジウムが溶解された酢酸緩衝液が挙げられる。こうして導電性ダイヤモンド上に担持されたイリジウムは粒子状であるのが一般的である。

【0029】なお、触媒粒子の導電性ダイヤモンドへの密着性を高めるために、触媒粒子を析出させる前に、水酸化ナトリウム溶液中で導電性ダイヤモンドに正の電圧を印加して、ダイヤモンドを酸化させておくのが好ましい。

#### 【0030】測定法およびそのための装置

本発明にあっては、上記ダイヤモンド電極が過酸化水素

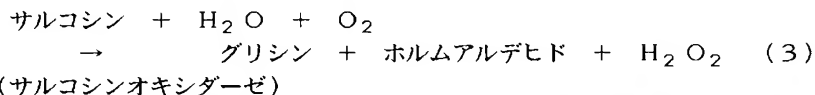
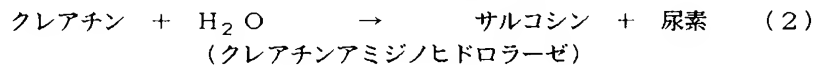
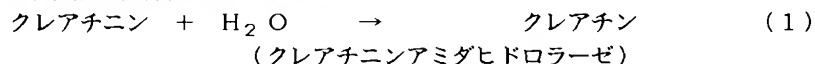
を電気化学的に特異的に酸化または還元し、対電極との間に電流が発生すると性質を利用して、被検試料中の過酸化水素を検出する。すなわち、ダイヤモンド電極の電位を正としたとき、電極表面で下記式(1)の酸化反



【0031】さらに、本発明にあつては、ダイヤモンド電極を作用電極とし、対電極との間に生じる電流値または電気量が系内の過酸化水素の濃度に正比例すると性質を利用して、被検試料中の過酸化水素の存在量を測定することができる。このように、過酸化水素の検出および定量は電流を検出することにより行われるため、測定時間は短かつ簡便である。したがって、本発明による方法は短時間の内に容易に過酸化水素を検出し、その濃度を知ることが出来る点で極めて有利である。

【0032】上述したように、本発明の方法を利用すれば、酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物の検出および定量を行うことができる。このような被検化合物の検出は、被検化合物を、ダイヤモンド電極に接触させる前に、酵素に接触させて、過酸化水素を生成させておき、その後、生成した過酸化水素を検出することにより行われる。このとき、酵素反応後の被検試料中の過酸化水素濃度と被検化合物濃度とは一致もしくは正比例の関係となるため、作用電極と対電極との間に生じる電流値または電気量は、結果的に系内の被検化合物の濃度に正比例する。したがって、この性質を利用して、被検試料中の被検化合物を定量的に検出することができる。

【0033】本発明の方法に用いる酵素は、被検化合物と接触して酵素反応により過酸化水素を生成するものを適宜選択して用いる。本発明の検出方法によれば、酵素の有する基質特異性により、被検化合物に対して極めて



【0035】本発明の方法において、被検化合物の検出および定量のための電気化学的系は、ダイヤモンド電極を作用電極とした以外は、一般的な電気化学的な系であることが出来る。

【0036】すなわち、本発明の方法にあつては、ダイヤモンド電極を作用電極とし、対電極とともに被検試料に接触させ、この二つの電極間に、ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応または還元反応の生じる電圧を印加し、この電圧下における電流を検出することにより、被検化合物を検出する。さらに、この得られた電流の電流値または電気量を測定することにより、被検試料中の被検化合物の濃度を算出することができる。上記し

応が起こり、ダイヤモンド電極の電位を負としたとき、電極表面で下記式(2)の還元反応が起こり、その結果、電流が発生する。

高い選択性を発揮する。被検化合物および酵素の好ましい組合せの例としては、グルコースおよびグルコースオキシダーゼ組合せ、シュウ酸およびシュウ酸オキシダーゼの組合せ、L-アミノ酸およびL-アミノ酸オキシダーゼの組合せ、コリンおよびコリンオキシダーゼの組合せ、アミンおよびアミンオキシダーゼの組合せ、アルコールおよびアルコールオキシダーゼの組合せ、コレステロールおよびコレステロールオキシダーゼの組合せ、アスコルビン酸およびアスコルビン酸オキシダーゼの組合せ、サルコシンおよびサルコシンオキシダーゼの組合せ、ラクテートおよびラクテートオキシダーゼの組合せ、ならびにグルタメートおよびグルタメートオキシダーゼの組合せなどが挙げられる。このような酵素は、シリカゲル等の担体に担持され、反応カラムに収容されることにより使用されるのが一般的である。

【0034】また、過酸化水素を生成する酵素反応が、二以上の酵素反応段階を経て過酸化水素を生成するものであってもよい。このような被検化合物および酵素の好ましい例としては、クレアチニンと、クレアチニンアミダヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、およびサルコシンオキシダーゼの三種類の酵素との組合せが挙げられる。このクレアチニンは、上記三種類の酵素と接触することにより、下記(1)～(3)の三段階の酵素反応を経て、過酸化水素を生成する。

たように、過酸化水素の酸化または還元により、ダイヤモンド電極と対電極との間に生じる電流値または電気量は、系内の被検化合物の濃度に正比例する。従って、一旦ある電圧値における電流値または電気量と被検化合物の濃度との関係を求めておけば、その関係から、得られた電流値に対応する被検試料中の被検化合物の濃度を容易に知ることが出来る。すなわち、本発明の好ましい態様にあつては、被検化合物の濃度と電流値または電気量との検量線を予め作成しておき、この検量線と、得られた電流値または電気量とを対比することにより、被検化合物の濃度を知ることが出来る。

【0037】本発明において対電極としては、白金、炭



素、ステンレス、金、ダイヤモンド、 $\text{SnO}_2$ 等の利用が好ましい。

【0038】本発明の好ましい態様によれば、対電極の表面積が、ダイヤモンド電極の表面積の10倍以上であるのが好ましく、より好ましくは100倍以上、さらに好ましくは1000倍以上、である。これにより、参照電極を用いることなく、高い測定精度を実現することができる。このような大表面積の対電極の好ましい例としては、白金電極上にさらに白金めっきが施されてなる白金黒などが挙げられる。

【0039】本発明において、作用電極であるダイヤモンド電極と、対電極との間に印加される電圧は、ダイヤモンド電極上で過酸化水素の酸化反応あるいは還元反応が生じるものであれば限定されないが、測定効率および精度の観点から、この印加電圧は、過酸化水素の酸化または還元のピーク電流を与える電圧であることが好ましい。ここで、ピーク電流とは、例えばサイクリックボルタメトリーにより、最大電流値を与える電圧として求めることができる。ただし、ピーク電流付近でバックグラウンド電流が著しく増大してしまう場合においては、バックグラウンド電流が測定に悪影響を及ぼさない程度に低い範囲内で最もピーク電流に近い電圧、例えばバックグラウンド電流と酸化反応により生じる電流との差が最も大きくなる電圧、を選択するのが、安定かつ高感度の測定を行える点で好ましい。さらに、本発明の別の好ましい態様によれば、最大電流値を与える電圧は、回転電極法またはマイクロ電極法により求めることができる。回転電極法またはマイクロ電極法によれば、測定条件等による測定誤差の可能性をより排除出来る点で有利である。

【0040】さらに、本発明の好ましい態様によれば、参照電極を被験試料中に接触させ、ダイヤモンド電極と、対電極との間に、ダイヤモンド電極上で酸化反応または還元反応の生じる電圧の絶対値を制御することが、測定精度の観点から好ましい。参照電極は公知のものを利用することが出来、飽和カロメル電極（SCE）、標準水素電極、銀塩化銀電極、水銀塩化水銀電極、水素パラジウム電極等が利用可能である。

【0041】本発明による測定方法において、電気化学的系は、ダイヤモンド電極を作用電極とした以外は、一般的な電気化学的な系であることが出来るが、本発明の好ましい態様によれば、所定の溶液を一定流速でキャリアとして系内を流し、そのキャリア溶液中に被験試料を注入して測定を行う、フローセルを用いたフローインジェクション法による測定が好ましい。

【0042】フローセルを用いたフローインジェクション法の概略は図2に示される通りである。フローセル25には、キャリア溶液溜21から、ポンプ22によりキャリア溶液が注入される。ポンプ22とフローセル25との間には、被験試料注入口23が設けられ、キャリア

溶液に被験試料が注入可能とされる。フローセル25を通過したキャリア溶液は、廃液溜26に集められる。また、酵素反応により過酸化水素を生成する被検化合物を検出する場合には、過酸化水素の検出に先立ち酵素反応が行われるように、被験試料注入口23とフローセル25との間に、酵素が担持された触媒担体が充填されてなる反応器24が設けられる。

【0043】フローセル25の基本構造は図3に示される通りである。フローセル25は、ダイヤモンド電極11、対電極32、および参照電極33が、キャリア溶液および被験試料が流れる流路34内に露出され、被験試料と接触出来るよう構成されている。なお、図3において、対電極32が紙面垂直方向に延在してなる。ダイヤモンド電極11は、基本的に図1に示される構造を有し、図1におけるダイヤモンド電極11のイリジウム粒子14側の最表面が、流路34内に露出され、キャリア溶液および被験試料と接触する。キャリア溶液は、流路34の流入口35から入り、図中の矢印のように流れ、流出口36に至る。ダイヤモンド電極11の導線Aおよび対電極32の導線Bの間に、過酸化水素をダイヤモンド電極11上で酸化または還元させる電圧を印加する。

【0044】測定は以下のように行われる。まず、被験試料を注入しないキャリア溶液のみを流し、いわゆるバックグラウンド電流を出来るだけ小さくし、かつ安定させる。ダイヤモンド電極はバックグラウンド電流が小さいことを特長とする。次に、被験試料を被験試料注入口23より注入する。この注入は継続して行われてもよいが、ピーク電流を測定可能な程度の量を一時期に注入してもよい。被検化合物が被験試料中に含まれている場合、過酸化水素がダイヤモンド電極11上で酸化または還元され、それに伴う電流を検出できる。この電流の電流値または電気量を測定することにより、被検化合物の濃度を知る。

【0045】本発明の別の好ましい態様によれば、フローセル25におけるダイヤモンド電極11をマイクロ電極の形態とすることも好ましい。また、本発明の別の好ましい態様によれば、ダイヤモンド電極11を回転電極としてもよい。

【0046】さらに、本発明の別の態様によれば、被験試料中のグルコースの濃度を測定する装置が提供される。この装置の基本構成は図4に示される通りである。図4の装置において、電源・電流計41には、図2に記載のフローセルより、ダイヤモンド電極11に接続される導線A、対電極32に接続される導線B、および参照電極33に接続される導線Cが接続される。この電源・電流計41は、ダイヤモンド電極と対電極との間にダイヤモンド電極上で酸化または還元反応の生じる電圧を印加する手段と、この印加電圧下における電流値または電気量を測定する手段とを兼ねるものである。すなわち、この電源・電流計41によって、ダイヤモンド電極11



および対電極 3 2 の間に、過酸化水素をダイヤモンド電極 1 1 上で酸化または還元させる電圧を印加し、さらに過酸化水素のダイヤモンド電極 1 1 上での酸化または還元反応に伴う電流値または電気量を測定する。この電流値または電気量は、電流値比較・濃度算出装置 4 2 に送られる。この装置 4 2 には、検量線データ 4 3 が送られ、この装置内において、電源・電流計 4 1 から送られた電流値と、検量線データを比較し、被検化合物の濃度を算出する。すなわち、得られた電流値または電気量から被検試料中の被検化合物の濃度を算出する手段を備える。得られた被検化合物濃度は、表示装置 4 4 により表示される。

【0047】本発明の好ましい態様によれば、過酸化水素を生成する酵素反応が二以上の酵素反応段階を経る場合にあっては、各反応段階で用いられる酵素を、反応させようとする順に、反応器 2 4 内の、被検試料の流出方向に連続する各領域に分離させて収容するのが好ましい。三種類の酵素を分離収容した反応器の例を図 5 に示す。図 5 の反応器 2 4 において、被検試料の流出方向に対し、上流側から第一酵素反応部 5 1、第二酵素反応部 5 2、第三酵素反応部 5 3 が形成されており、各部に各反応段階に応じた異なる酵素担体が収容される。例えば、被検化合物がクレアチニンの場合にあっては、第一酵素反応部 5 1 にクレアチニンアミダヒドラーゼが、第二酵素反応部 5 2 にクレアチンアミジノヒドラーゼが、第三酵素反応部 5 3 にサルコシンオキシダーゼがそれぞれ収容される。

【0048】

【実施例】以下の実施例によって本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

【0049】例 1：イリジウム担持ダイヤモンド電極の作製

公知の方法に従い、導電性 n 型シリコン (111) 面上に、ホウ素を高濃度 (10, 000 ppm, B/C 比) で導入したダイヤモンド薄膜を、マイクロ波プラズマ CVD 装置を用いて形成した。得られたダイヤモンド薄膜付シリコン基板を、0.1 M の水酸化ナトリウム溶液に浸漬し、2.4 V (対飽和カロメル電極) の電圧を 30 分間印加して、ダイヤモンド薄膜の表面を酸化させた。その後、酸化されたダイヤモンド薄膜を、pH 5 の 0.1 M 酢酸緩衝液に溶かした 1 mM イリジウム溶液に浸漬して、-0.9 V (対飽和カロメル電極) の電圧を 30 分間印加して、ダイヤモンド薄膜の表面にイリジウムを担持させた。こうして、イリジウム担持ダイヤモンド電極を得た。得られたダイヤモンド電極の表面を走査型電子顕微鏡 (SEM) により観察した。その結果は、図 6 に示される通りであった。図 6 に示されるように、ダイヤモンド薄膜の表面にイリジウムが粒子状に担持されていることが確認された。

【0050】例 2：過酸化水素の定量

0.1 M のホスフェート緩衝溶液に、過酸化水素を加え、過酸化水素濃度 0、0.5、1、2、4、8、および 10 mM の溶液を用意した。この溶液に、作用電極として例 1 で調製したダイヤモンド電極を浸け、また対電極として白金電極を浸け、さらに参照電極として飽和カロメル電極を浸けて、電気化学測定用フローセルを構成した。作用電極に 0.6 V (対参照電極) の電圧を印加し、ピーク電流を測定した。以上のピーク電流値と過酸化水素の濃度から、図 7 に示される検量線が得られた。また、印加する電圧を -0.1 V (対参照電極) としたこと以外は上記同様にして、ピーク電流を測定した。その結果、図 7 に示される検量線が得られた。図 7 に示されるように、過酸化水素濃度に比例して検出電流も推移した。

【0051】得られた検量線を用いて、過酸化水素濃度の測定を行った。まず、1 mM の濃度 (理論値) の過酸化水素溶液を調製した。この溶液をフローセルに注入し、作用電極に 0.6 V (対参照電極) の電圧を印加して、ピーク電流値を測定した。その結果、ピーク電流値は 72 nA であった。このピーク電流値を図 7 に示される検量線に当てはめることにより溶液の過酸化水素濃度を算出したところ、1 mM であり、上記理論値と概ね一致した。

【0052】例 3：グルコースの定量

まず、反応器の作製を以下のようにして行った。平均粒径 5  $\mu$ m、孔サイズ 270 Å のシリカビーズ 2 g を用意した。このシリカビーズを、3-アミノプロピトリエトキシシラン (APTES) 10 重量% を含むヘキサンを用いて 2 時間シラン化処理して、汜別した。得られたシリカビーズを、グルタルアルデヒド 2 重量% を 0.1 M ホスフェート緩衝溶液に含む溶液 50 mL で 2 時間処理して、汜別した。得られたシリカゲルを、ホスフェート緩衝溶液中のグルコースオキシダーゼ 100 mg に浸し、4℃ で 24 時間処理して、グルコースオキシダーゼの固定化を行った。得られたシリカゲルを、フローポンプを用いてステンレス鋼製のカラムに充填して、反応器を得た。この反応器に、キャリア溶液溜、ポンプ、被検試料注入口、および例 2 と同様にして作製したフローセルとを、図 2 に示されるように連結して、試料溶液が系全体を流れるように構成した。

【0053】次に、検量線の作成を以下のようにして行った。0.1 M のホスフェート緩衝溶液に、グルコースを加え、グルコース濃度 0.1、0.2、0.5、1、2、4、8、および 10 mM のグルコース溶液を用意した。また、比較のため、ブランクとして、グルコースを含有しない 0.1 M のホスフェート緩衝溶液 (pH 7) も用意した。これらの溶液を装置の被検試料注入口に注入し、一定流速で系内を流した。反応器から流出した試料溶液をフローセルに導き、-0.1 V (対参照電極)

の電圧下で電流値の変化を測定した。その結果は、図8に示される通りであった。得られたピーク電流値とグルコース濃度から、図9に示される検量線が得られた。

【0054】得られた検量線を用いて、グルコース濃度の測定を行った。まず、0.5 mMの濃度（理論値）のグルコース溶液を調製した。この溶液をフローセルに注入し、作用電極に-0.1 V（対参照電極）の電圧を印加して、ピーク電流値を測定した。その結果、ピーク電流値は43 nAであった。このピーク電流値を図9に示される検量線に当てはめることにより溶液の過酸化水素濃度を算出したところ、0.5 mMであり、上記理論値と概ね一致した。

#### 【0055】例4：クレアチニンの検出

まず、反応器の作製を以下のようにして行った。クレアチニンアミダヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、およびサルコシンオキシダーゼの三種の酵素を用意した。これら三種の酵素を、それぞれ、シリカゲルに固定化させた。得られたシリカゲルを、フローポンプを用いてステンレス鋼製のカラムに充填して、反応器を得た。このとき、図5に示されるように、クレアチニンアミダヒドロラーゼ、クレアチンアミジノヒドロラーゼ、サルコシンオキシダーゼの順に、反応器内の、被検試料の流出方向に連続する三つの領域に分離して収容されるように、シリカゲルの充填を行った。この反応器に、キャリア溶液溜、ポンプ、被検試料注入口、および例2と同様にして作製したフローセルとを、図2に示されるように連結して、試料溶液が系全体を流れるように構成した。

【0056】次に、クレアチニンの検出を以下のようにして行った。0.1 Mのホスフェート緩衝溶液に、クレアチニンを加え、1 mMのクレアチニン含有溶液を用意した。また、比較のため、0.5、1、および5 mMの過酸化水素溶液、およびブランクとしての0.1 Mのホスフェート緩衝溶液を用意した。これらの溶液を装置の被検試料注入口に注入し、流速0.5 mL/分で系内を流した。反応器から流出した試料溶液をフローセルに導き、0.6 V（対参照電極）の電圧下で電流値の変化を測定した。その結果は、図10に示される通りであった。

#### 【0057】例5：サルコシンの定量

まず、反応器の作製を以下のようにして行った。平均粒径5  $\mu$ m、孔サイズ270 Åのシリカビーズ0.7 gを用意した。このシリカビーズを、3-アミノプロピトリエトキシシラン（APTES）10重量%を含むヘキサンをを用いて2時間シラン化処理して、汙別した。得られたシリカビーズを、グルタルアルデヒド2重量%を0.1 Mホスフェート緩衝溶液中含む溶液50 mLで2時間処理して、汉別した。得られたシリカゲルを、ホスフェート緩衝溶液中のサルコシンオキシダーゼ100 mgに浸し、4℃で24時間処理して、サルコシンオキ

シダーゼの固定化を行った。得られたシリカゲルを、フローポンプを用いてステンレス鋼製のカラムに充填して、反応器を得た。この反応器に、キャリア溶液溜、ポンプ、被検試料注入口、および例2と同様にして作製したフローセルとを、図2に示されるように連結して、試料溶液が系全体を流れるように構成した。

【0058】次に、検量線の作成を以下のようにして行った。0.1 Mのホスフェート緩衝溶液（pH7）に、サルコシンを加え、サルコシン濃度5、10、50、100、200、400、800  $\mu$ Mのサルコシン溶液を用意した。また、比較のため、ブランクとして、サルコシンを含有しない0.1 Mのホスフェート緩衝溶液（pH7）も用意した。これらの溶液を装置の被検試料注入口に注入し、一定流速で系内を流した。反応器から流出した試料溶液をフローセルに導き、-0.1 V（対参照電極）の電圧下で電流値の変化を測定した。その結果は、図11に示される通りであった。得られたピーク電流値とサルコシン濃度から、図12に示される検量線が得られた。また、印加する電圧を0.6 V（対参照電極）としたこと以外は上記同様にして、ピーク電流を測定した。その結果、図12に示される検量線が得られた。図12に示されるように、サルコシン濃度に比例して検出電流も推移した。したがって、サルコシンについても、例3のグルコースの場合と同様、サルコシン濃度を正確に測定できることが分かる。

#### 【0059】例6：センサの選択性

例5で用いたサルコシン定量のための測定系を用いて、サルコシン以外の電気的活性物質を添加したときの、ピーク電流値に及ぼす影響を以下のようにして調べた。まず、0.1 Mホスフェート緩衝溶液（pH7）および各電気的活性物質を用いて、1 mMホスフェート緩衝溶液、1 mMグルコース溶液、1 mMアスコルビン酸溶液、1 mMコリン溶液、1 mMシュウ酸溶液、および1 mM尿酸溶液をそれぞれ調製した。また、比較のため、1 mMサルコシン溶液も用意した。これらの各溶液を装置の被検試料注入口に注入し、一定流速で系内を流した。反応器から流出した試料溶液をフローセルに導き、-0.1 V（対参照電極）の電圧下で電流値の変化を測定した。その結果は、図13に示される通りであった。図13において、Aがサルコシンに、Bがホスフェート緩衝溶液に、Cがグルコースに、Dがアスコルビン酸に、Eがコリンに、Fがシュウ酸に、Gが尿酸にそれぞれ対応する。図13に示されるように、サルコシン以外の物質により生じる電流値ピークは極めて小さい。すなわち、例5で用いた測定系はサルコシンに対して高い選択性を有することが確認された。

【0060】例4～例6の結果から明らかなように、本発明の方法によれば、クレアチニンを三段階の酵素反応に付して、クレアチン、サルコシンの順に変化させることにより、その存在を高い選択性で検出し、かつ、その

濃度を高い精度で測定することができる。

#### 【0061】例7：オキサレートの検出

まず、反応器を有しないこと以外は、例3と同様の測定系を構成した。次に、オキサレート1 mMと、オキサレートオキシダーゼ0.2 mg/mLとを含む、0.1 Mホスフェート緩衝溶液を用意した。また、比較のため、オキサレートオキシダーゼを含まないこと以外は上記同様の溶液、およびブランクとしての0.1 Mホスフェート緩衝溶液(pH7)も用意した。これらの溶液を装置の被検試料注入口に注入し、系内を流した。試料溶液をフローセルに導き、0.6 V(対参照電極)の下で電流値の変化を測定した。その結果は、図14に示される通りであった。

#### 【0062】例8：コリンの定量

まず、反応器の作製を以下のようにして行った。平均粒径5 μm、孔サイズ270 Åのシリカビーズ0.7 gを用意した。このシリカビーズを、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)10重量%を含むヘキサンを用いて2時間シラン化処理して、汙別した。得られたシリカビーズを、グルタルアルデヒド2重量%を0.1 Mホスフェート緩衝溶液に含む溶液50 mLで2時間処理して、汉別した。得られたシリカゲルを、ホスフェート緩衝溶液中のコレストロールオキシダーゼ30 mg(24 U/mg)に浸し、4℃で24時間処理して、コリンオキシダーゼの固定化を行った。得られたシリカゲルを、フローポンプを用いてステンレス鋼製のカラムに充填して、反応器を得た。この反応器に、キャリア溶液溜、ポンプ、被検試料注入口、および例2と同様にして作製したフローセルとを、図2に示されるように連結して、試料溶液が系全体を流れるように構成した。

【0063】次に、検量線の作成を以下のようにして行った。0.1 Mのホスフェート緩衝溶液(pH7)に、コリンを加え、コリン濃度5、10、50、100、200、400、800、1000 μMのコリン溶液を用意した。また、比較のため、ブランクとして、コリンを含有しない0.1 Mのホスフェート緩衝溶液(pH7)も用意した。これらの溶液を装置の被検試料注入口に注入し、一定流速で系内を流した。反応器から流出した試料溶液をフローセルに導き、-0.1 V(対参照電極)の電圧下で電流値の変化を測定した。その結果は、図15に示される通りであった。得られたピーク電流値とコリン濃度から、図16に示される検量線が得られた。また、印加する電圧を0.6 V(対参照電極)としたこと以外は上記同様にして、ピーク電流を測定した。その結果、図16に示される検量線が得られた。図16に示されるように、コリン濃度に比例して検出電流も推移した。したがって、コリンについても、例3のグルコースの場合と同様、コリン濃度を正確に測定できることが分かる。

#### 【0064】例9：コレストロールの定量

まず、反応器の作製を以下のようにして行った。平均粒径5 μm、孔サイズ270 Åのシリカビーズ0.7 gを用意した。このシリカビーズを、3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APTES)10重量%を含むヘキサンを用いて2時間シラン化処理して、汉別した。得られたシリカビーズを、グルタルアルデヒド2重量%を0.1 Mホスフェート緩衝溶液に含む溶液50 mLで2時間処理して、汉別した。得られたシリカゲルを、ホスフェート緩衝溶液中のコレストロールオキシダーゼ30 mg(24 U/mg)に浸し、4℃で24時間処理して、コリンオキシダーゼの固定化を行った。得られたシリカゲルを、フローポンプを用いてステンレス鋼製のカラムに充填して、反応器を得た。この反応器に、キャリア溶液溜、ポンプ、被検試料注入口、および例2と同様にして作製したフローセルとを、図2に示されるように連結して、試料溶液が系全体を流れるように構成した。

【0065】次に、検量線の作成を以下のようにして行った。0.1 Mのホスフェート緩衝溶液(pH7)に、コレストロールを加え、コレストロール濃度5、10、50、100、200、400、800、1000 μMのコレストロール溶液を用意した。また、比較のため、ブランクとして、コレストロールを含有しない0.1 Mのホスフェート緩衝溶液(pH7)も用意した。これらの溶液を装置の被検試料注入口に注入し、一定流速で系内を流した。反応器から流出した試料溶液をフローセルに導き、-0.1 V(対参照電極)の電圧下で電流値の変化を測定した。その結果は、図17に示される通りであった。得られたピーク電流値とコレストロール濃度から、図18に示される検量線が得られた。図18に示されるように、コレストロール濃度に比例して検出電流も推移した。したがって、コレストロールについても、例3のグルコースの場合と同様、コレストロール濃度を正確に測定できることが分かる。

#### 【図面の簡単な説明】

【図1】ダイヤモンド電極の構造を示す図であり、

(a)はダイヤモンド電極11の断面図であり、この電極は、基材12の上に形成された導電性ダイヤモンド薄膜13およびイリジウム粒子14からなる。(b)は、ダイヤモンド電極11の斜視図である。

【図2】本発明による測定法に用いられるフローインジェクション法の概略を示す図である。

【図3】図2に示されるフローインジェクション法に用いられるフローセルの基本構造を示す図である。

【図4】本発明による測定装置の基本構成を示す図である。

【図5】図2に示される反応器であって、三種類の酵素を分離して収容した態様を示す図である。

【図6】例1において作製された、本発明のイリジウム担持ダイヤモンド電極表面の走査型電子顕微鏡(SEM)画像である。

【図7】例2において作成された、過酸化水素濃度と、ピーク電流値との検量線である。

【図8】例3において得られた、各グルコース濃度と、ピーク電流とを表す図である。

【図9】例3において作成された、グルコース濃度と、ピーク電流値との検量線である。

【図10】例4において得られた、1 mMのクレアチニン含有試料を添加したときの、ピーク電流の変化を示す図である。

【図11】例5において得られた、各サルコシン濃度と、ピーク電流とを表す図である。

【図12】例5において作成された、サルコシン濃度と、ピーク電流値との検量線である。

【図13】例6において得られた、各電気的活性物質を

添加した場合における、ピーク電流を表す図である。

【図14】例7において得られた、1 mMオキサレートおよび0.2 mg/mLオキサレートオキシダーゼ含有試料を添加したときの、ピーク電流の変化を示す図である。

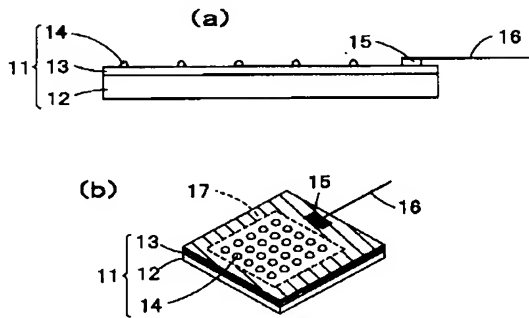
【図15】例8において得られた、各コリン濃度と、ピーク電流とを表す図である。

【図16】例8において作成された、コリン濃度と、ピーク電流値との検量線である。

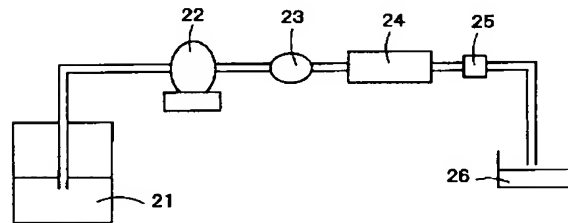
【図17】例9において得られた、各コレステロール濃度と、ピーク電流とを表す図である。

【図18】例9において作成された、コレステロール濃度と、ピーク電流値との検量線である。

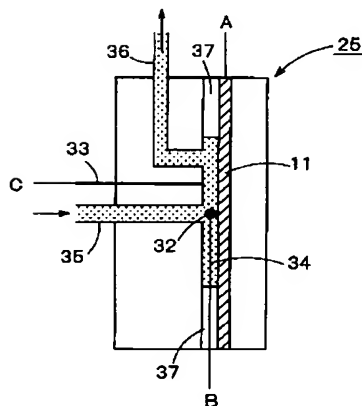
【図 1】



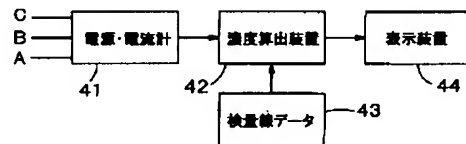
【図2】



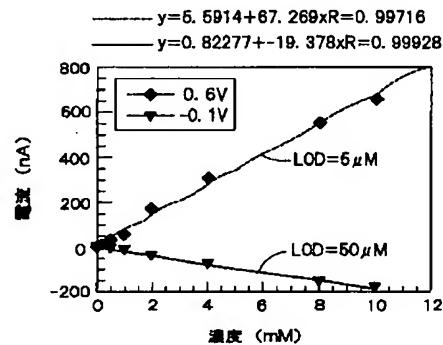
【図3】



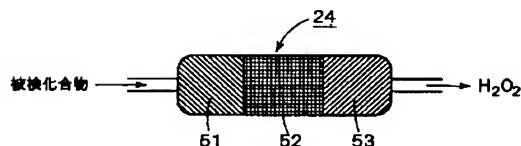
【図4】



【図7】



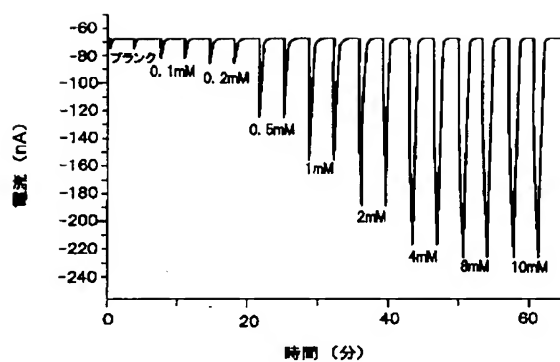
【図5】



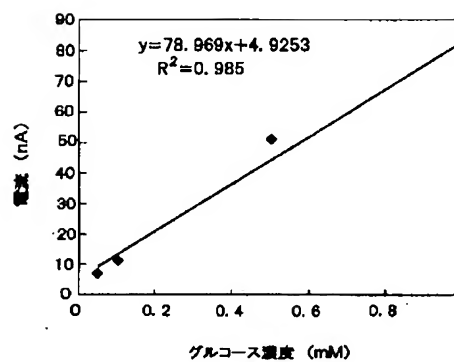
【図6】



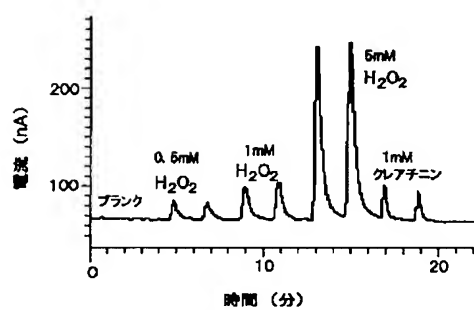
【図8】



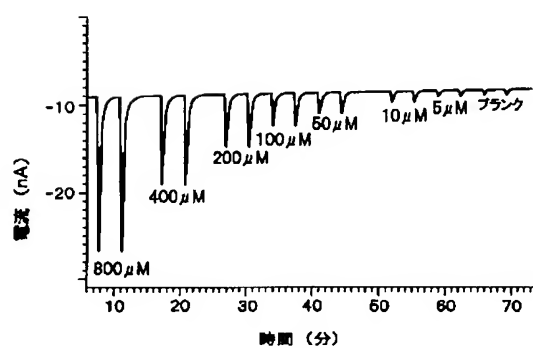
【図9】



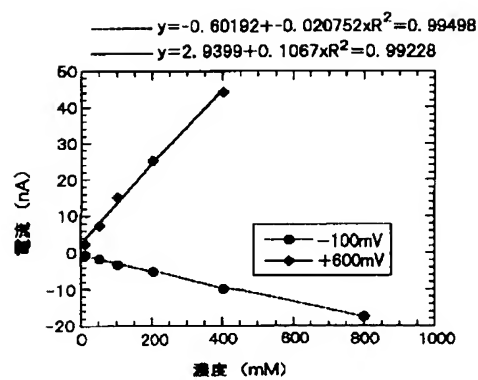
【図10】



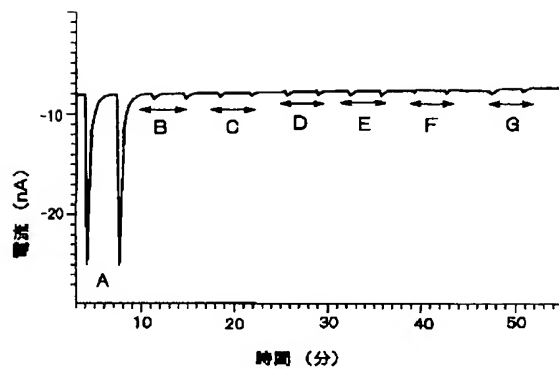
【図11】



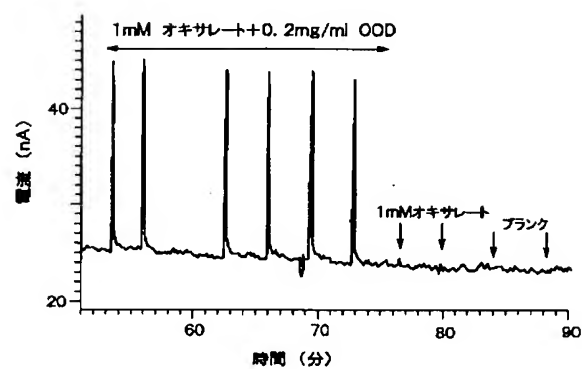
【図12】



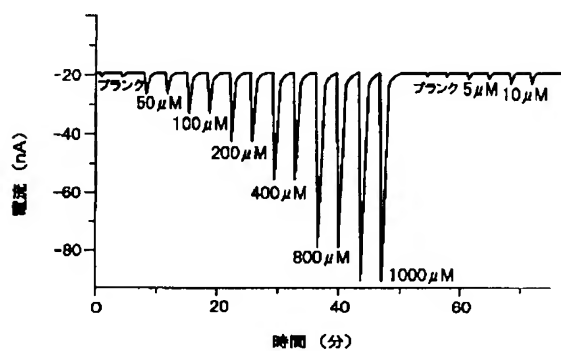
【図13】



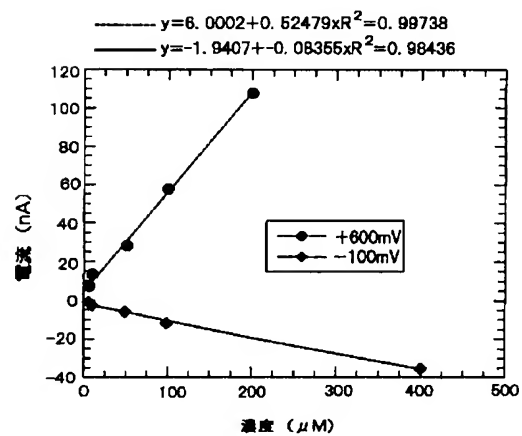
【図14】



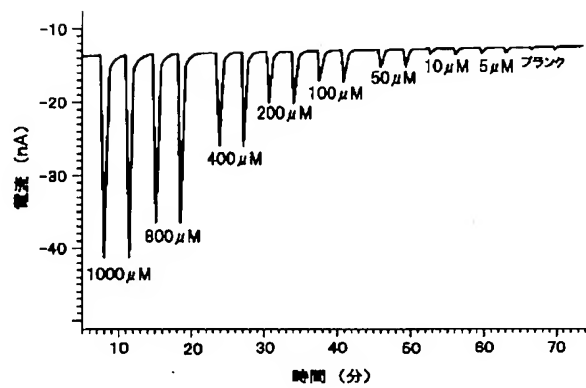
【図15】



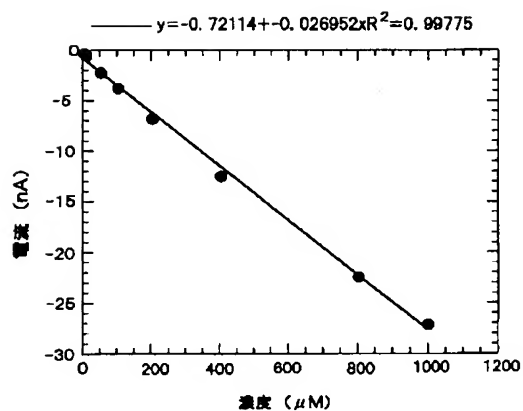
【図16】



【図17】



【図18】




---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>		識別記号	F I	ターム (参考)
C 1 2 Q	1/54		C 1 2 Q 1/60	
	1/60		G 0 1 N 27/28	3 2 1 A
G 0 1 N	27/28	3 2 1		3 2 1 G
			27/30	B
	27/30			Z
			31/00	M
	27/327		27/46	3 3 6 B
	31/00			3 0 1 G
				3 3 8
				3 3 6 J
				3 3 6 G
			27/30	3 5 3 U
				3 5 3 R

F ターム (参考) 2G042 AA01 BB11 CB03 FA07 FA20  
 HA02  
 4B029 AA07 BB16 CC03 FA12 FA13  
 4B063 QA01 QQ61 QQ68 QQ76 QQ80  
 QQ84 QQ89 QQ93 QR82 QS28  
 QS39 QX04